



Καθηγητής Δημήτριος Κουρέτας
Επίκουρος Καθηγητής Δημήτριος
Στάγκος

ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα "ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ"

Λάρισα, 2021

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές οξυγόνου

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή άτομο, που διαθέτει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Jenkins 1988). Το παραπάνω φαινόμενο μπορεί να προκύψει είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή στοιβάδα (Mylonas and Kouretas 1999). Τα συγκεκριμένα μόρια είναι ιδιαίτερα ασταθή κι έτσι μπορούν να αντιδρούν με άλλα μόρια οξειδώνοντάς τα. Η αντίδραση αυτή γίνεται με σκοπό τη συμπλήρωση της εξωτερικής στιβάδας των ελευθέρων ριζών. Στον οργανισμό, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με ποικίλα βιομόρια επηρεάζοντας τη φυσιολογική λειτουργία τους.

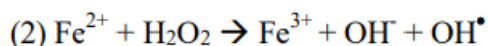
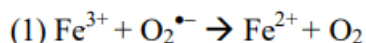
Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν μία ετερογενή ομάδα μορίων. Η πιο απλή εξ αυτών είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα πρωτόνιο κι ένα ηλεκτρόνιο. Ανάλογα με το κεντρικό τους άτομο, οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να ανήκουν στις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), τις δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), τις δραστικές μορφές θείου (Reactive Sulphur Species, RSS) ή τις δραστικές μορφές χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RClS). Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες μπορούν να παραχθούν μετά από αντιδράσεις με τις ROS, οι οποίες συναντώνται συνηθέστερα στον οργανισμό (Veskoukis et al. 2012a). Στις ROS ανήκουν οι ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}), περοξυλίου (ROO^{\cdot}), αλκοξυλίου (RO^{\cdot}), υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}), καθώς και οι μη ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), υποβρωμιώδες οξύ ($HOBr$), όζον (O_3) και μονήρες οξυγόνο (1O_2).

Παραγωγή ελευθέρων ριζών

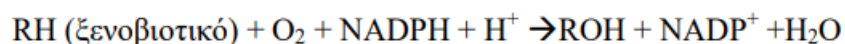
Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς πηγές.

Ενδογενείς πηγές

Η μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών παράγεται ενδογενώς κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, που πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Di Meo and Venditti 2001). Κατά τη διαδικασία παραγωγής του ATP πολλά ηλεκτρόνια μπορούν να διαφύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων. Επειδή το οξυγόνο καταναλώνεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες ανήκουν στις ROS. Η αναγωγή της NADH-ουβικινόνης (σύμπλοκο I) και η αναγωγή του κυτοχρώματος (σύμπλοκο II) είναι συνήθεις θέσεις παραγωγής $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 (Chance et al. 1979). Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και το $FADH_2$ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $O_2^{\cdot-}$ (Veskoukis et al. 2012a). Η $O_2^{\cdot-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD). Μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss (1) και Fenton (2) ανάμεσα στην $O_2^{\cdot-}$ και στο H_2O_2 παράγεται OH^{\cdot} :



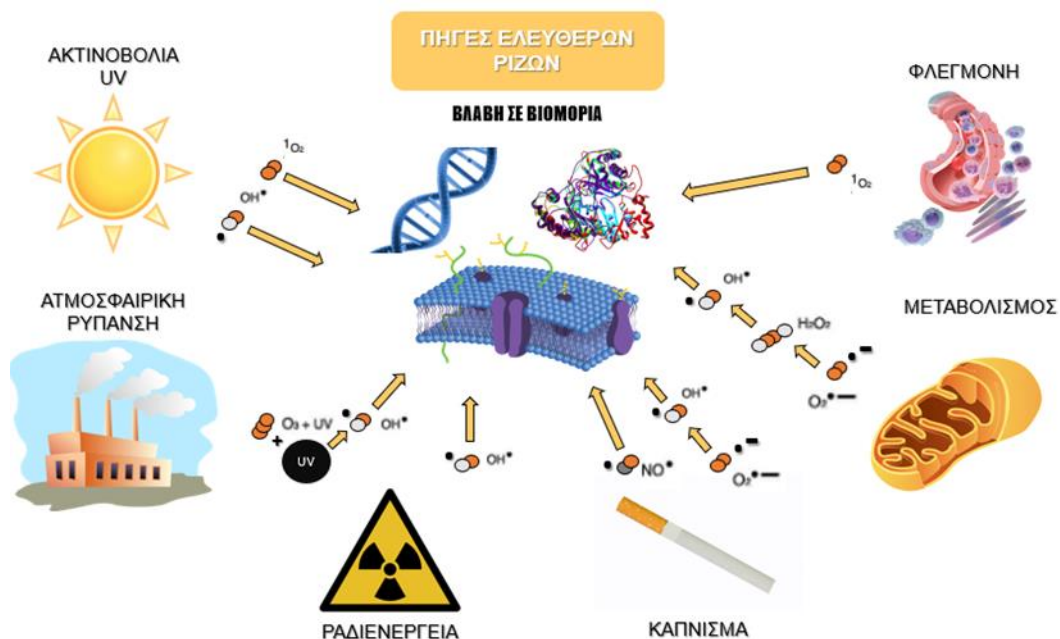
Εκτός από τις ROS, στα μιτοχόνδρια μπορεί να παραχθεί και μονοξείδιο του αζώτου (NO^{\cdot}) από τη συνθάση του NO^{\cdot} . Μία άλλη πηγή ROS και κυρίως H_2O_2 είναι τα υπεροξειδισώματα, τα οποία είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια που περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα για τη διάσπαση διαφόρων βλαβερών ουσιών για το κύτταρο. Σε κάποια κύτταρα και κυρίως στα ηπατικά, μπορούν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες κατά τις αντιδράσεις του συστήματος του κυτοχρώματος P-450. Τα κυτοχρώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών με κύριο μηχανισμό τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH στο O_2 οξειδώνοντας το υπόστρωμα, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η αιμοσφαιρίνη είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά οξυγόνου στα κύτταρα με σκοπό αυτό να συμμετάσχει στη διαδικασία παραγωγής ενέργειας. Κατά τη διάρκεια, όμως, έντονης άσκησης οι απαιτήσεις για οξυγόνο είναι μεγάλες. Σε τέτοιες συνθήκες, η αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει σε παραγωγή ROS (Ames et al. 1981; Thomas 2000) και συγκεκριμένα $O_2^{\bullet-}$ (Cooper et al. 2002). Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τη μυοσφαιρίνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 (Brantley et al. 1993). Επίσης, οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορούν να αποτελέσουν πηγή ελευθέρων ριζών, όπως και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα.

Εξωγενείς πηγές

Σε αυτές περιλαμβάνονται διάφοροι ετερογενείς παράγοντες, όπως είναι το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου, η ηλιακή και η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και τα βιομηχανικά απόβλητα. Πολλά φάρμακα, επίσης, ευθύνονται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά και άλλες ξеноβιοτικές ουσίες, όπως διάφορες τοξίνες, τα εντομοκτόνα και το αλκοόλ. Η διατροφή παίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (Ames 1981; Halliwell and Gutteridge 2015).



Εικόνα. Εξωγενείς και ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.

Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Θετικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν συνδεθεί, κυρίως, με την επιβλαβή δράση τους στον οργανισμό, ωστόσο έχει δειχθεί ότι συμμετέχουν και σε φυσιολογικές διαδικασίες αυτού. Πολλές από τις ελεύθερες ρίζες και ειδικά οι ROS παίζουν ρόλο στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος απέναντι στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης (Jenkins 1988). Αυτό συμβαίνει και κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, που μπορεί να εμφανιστεί για διάφορους λόγους, όπως μετά από έντονη άσκηση που προκαλεί μυϊκό τραυματισμό (Malm 2001). Οι ελεύθερες ρίζες πολλές φορές έχουν ρόλο σηματοδοτικών μορίων συμμετέχοντας στη διακυτταρική επικοινωνία (Reid 2001), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μυϊκή συστολή και την έκφραση γονιδίων (Ji et al. 1999). Η αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής, ενώ η αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

Αρνητικές επιδράσεις

Η υπέρμετρη παραγωγή ελευθέρων ριζών ευθύνεται για τη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Halliwell and Gutteridge 2015), τη μυϊκή καταστροφή (Nikolaidis et al. 2008) και την κόπωση (Bettors et al. 2004). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το 2% - 5% του O_2 , που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης στα μιτοχόνδρια σκελετικών μυών οδηγεί στην παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ στην ηρεμία (Sjödín et al. 1990). Εντούτοις, πιο πρόσφατα έχει δειχτεί ότι η διαρροή του O_2 στα μιτοχόνδρια του καρδιακού μυός κυμαίνεται από 0,4% ως 0,8% (Hansford et al. 1997) ή συμβαίνει σε ποσοστό 0,15% στο σκελετικό μυ (St-Pierre et al. 2002). Επιπλέον, όταν τα μιτοχόνδρια εργάζονται έντονα για την παραγωγή ATP από το ADP, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της άσκησης, το ποσοστό οξυγόνου, που μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες μειώνεται περίπου στο ένα δέκατο του ποσοστού κατά την ηρεμία (Viña et al. 2000). Οι ελεύθερες ρίζες, επίσης, οξειδώνουν

διάφορα βιομόρια όπως τα λιπίδια των μεμβρανών, οι πρωτεΐνες και το DNA. Έχουν, ακόμα, συσχετιστεί και με διάφορες ασθένειες, όπως του Parkinson, του Alzheimer, την κατάθλιψη και τη γήρανση (Halliwell and Gutteridge 2015).

Λιπίδια

Καθώς οι μεμβράνες, κυτταρικές και κυτταρικών οργανιδίων, αποτελούνται από λιπίδια, τα οποία είναι ευαίσθητα σε οξείδωση, κατά κύριο λόγο τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PolyUnsaturated Fatty Acids, PUFA), μπορούν να υποστούν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες. Η οξείδωση των PUFA είναι η εναρκτήρια αντίδραση του καταρράκτη των αντιδράσεων της λιπιδικής υπεροξείδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου ROO^{*}, συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεΐδης (Malonyl Dialdehyde, MDA). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητάς τους. Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young and McEneny 2001).

Πρωτεΐνες

Οι δομικές πρωτεΐνες μπορούν να οξειδωθούν από τις ROS με αποτέλεσμα την τροποποίηση της δομής και της λειτουργίας τους. Αποτέλεσμα της οξείδωσής τους είναι η δημιουργία πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων, που συχνά χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες. Η οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών έχει σημαντικές κυτταρικές επιπτώσεις, όπως είναι η απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα και τα λυσοσώματα. Ωστόσο, οι μεγάλοι μοριακού βάρους καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες, δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται δημιουργώντας συσσωματώματα (Levine 2002).

DNA

Το DNA είναι κατά κανόνα ένα σταθερό μόριο αλλά οι ROS μπορούν προκαλέσουν την οξειδωτική καταστροφή του. Οι βλάβες που, συνήθως, προκαλούνται είναι τροποποιήσεις στις βάσεις του, θραύσεις στις έλικές του, βλάβες στις πουρίνες, την εξόζη και στο σύστημα επιδιόρθωσής του. Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση (Radak et al. 1996).

Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

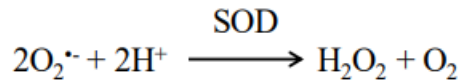
Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί κάθε ουσία που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell and Gutteridge 2015). Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί. Χαρακτηριστικά τους είναι ότι μπορούν να εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών, να αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες μετατρέποντάς τις σε λιγότερο δραστικά μόρια και να βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών, που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.

Ενζυμικοί μηχανισμοί

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD), η καταλάση (Catalase, CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

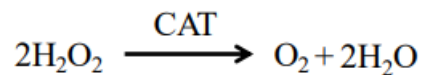
Είναι ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 , όπως φαίνεται παρακάτω:



Η $\text{O}_2^{\cdot-}$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD, ενώ όταν διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD, ή οποία βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στα μυϊκά κύτταρα.

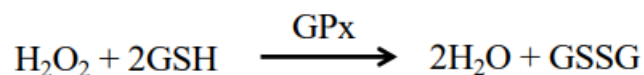
Καταλάση (CAT)

Η καταλάση βρίσκεται στα υπεροξειδισώματα, τα οποία συμβάλλουν στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας H_2O_2 (Antunes et al. 2002). Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 , όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση.



Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

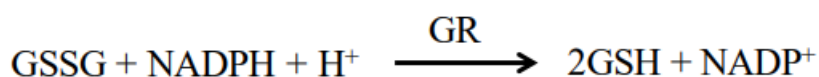
Είναι ένα ένζυμο, που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα και τον εξωκυττάριο χώρο. Όπως και η καταλάση, καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη, η οποία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οξειδώνεται (Antunes et al. 2002). Παρακάτω φαίνεται η αντίδραση, την οποία καταλύει η GPx.



Η GPx ενεργοποιείται όταν το H_2O_2 βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ η καταλάση δρα όταν η συγκέντρωση του H_2O_2 είναι υψηλή (Halliwell and Gutteridge 2015).

Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί σε φυσιολογικά επίπεδα το λόγο GSH/GSSG ενδοκυτταρικά. Η GR χρησιμοποιεί σα συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (Flavin adenine dinucleotide, FAD). Η φωσφορυλιωμένη μορφή του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι, σχηματίζονται δύο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH. Παρακάτω φαίνεται η αντίδραση, την οποία καταλύει η GR.



Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται μόρια με αντιοξειδωτικές ιδιότητες όπως η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, η β-καροτίνη, το ουρικό οξύ, η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο.

Βιταμίνη E

Είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Η πιο δραστική αλλά και πιο άφθονη είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυτταροπλασματική και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια και τη βιταμίνη A από την οξείδωση που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες (Halliwell and Gutteridge 2015).

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη και ταυτόχρονα ένα πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS (Halliwell and Gutteridge 2015).

B-καροτένιο

Είναι λιποδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Πιστεύεται ότι μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και το σελήνιο (Halliwell and Gutteridge 2015) .

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης τα επίπεδα του ουρικού οξέος αυξάνονται στο πλάσμα του αίματος (Green and Fraser 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα ασκώντας προστατευτικό ρόλο ενάντια στις ROS.

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Είναι υδατοδιαλυτό μόριο και παίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη προς την ανηγμένη μορφή της και το αντίστροφο. Στην ανηγμένη μορφή της οφείλονται οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της γλουταθειόνης (Halliwell and Gutteridge 2015).

Συνένζυμο Q10

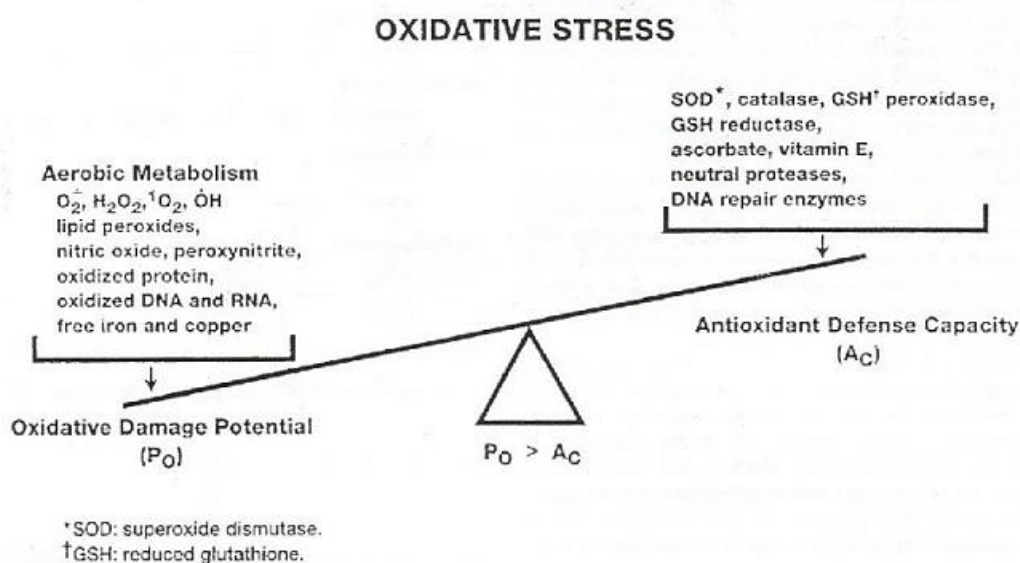
Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και συμβάλλει στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell and Gutteridge 2015).

Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία και βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπαράγοντας της GPx και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στην αντιοξειδωτική άμυνα (Halliwell and Gutteridge 2015).

Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι μία ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών, η οποία οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου ή/και μοριακή βλάβη (Sies και Jones, 2007). Προκαλεί βλάβες σε όλα τα βιολογικά μακρομόρια όπως το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, ενώ μπορεί ακόμη να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα. Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται τόσο από εξωγενείς πηγές, όπως οι ξеноβιοτικές ουσίες, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, το όζον, οι υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, η ακτινοβολία, η διατροφή και το κάπνισμα όσο και από ενδογενείς παράγοντες όπως διάφορα ένζυμα (π.χ. οξειδάση της ξανθίνης), ο αερόβιος μεταβολισμός στα μιτοχόνδρια και η δράση των λευκοκυττάρων.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Η μελέτη της δράσης μορίων, εκχυλισμάτων και τροφίμων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά μπορεί να παρέχει μία εικόνα για την αντιοξειδωτική και την πιθανή αντικαρκινική τους ικανότητα. Η μελέτη των παραπάνω μπορεί να γίνει τόσο με *in vitro* όσο και με *in vivo* πειραματικές διαδικασίες. Η πλειονότητα των *in vitro* πειραματικών δοκιμασιών μελετά την άμεση αντιοξειδωτική δράση. Συνήθως, χρησιμοποιείται μία τεχνητή ελεύθερη ρίζα και εκτιμάται η ικανότητα της προς διερεύνηση ουσίας να εξουδετερώνει τη ρίζα αυτή. Επίσης, είναι πλέον διαδεδομένη η μελέτη της δράσης αντιοξειδωτικών σε *in vitro* συστήματα κυτταροκαλλιέργειών. Η μελέτη των αντιοξειδωτικών σε κυτταροκαλλιέργειες μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τους μηχανισμούς με τους οποίους οι εξεταζόμενες ουσίες δρουν. Τέλος, η *in vivo* μελέτη μπορεί να αποκαλύψει πληροφορίες για τη δράση των αντιοξειδωτικών σε επίπεδο ιστών, οργάνων και τελικά ολόκληρων οργανισμών. Τα αντιοξειδωτικά χορηγούνται σε πειραματόζωα αλλά και σε ανθρώπους, εφόσον βέβαια είναι ασφαλή (π.χ. μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης χυμών φρούτων ή βιταμινών).

Στον παρόντα εργαστηριακό οδηγό παρουσιάζονται διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα, ευρέως χρησιμοποιούμενα στο ερευνητικό πεδίο της Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας. Ειδικότερα, θα μελετηθεί *in vitro* η αντιοξειδωτική δράση δειγμάτων χυμού, καφέ, τσαγιού και γάλακτος. Κατά την πρώτη εργαστηριακή άσκηση θα μελετηθεί *in vitro* η αντιοξειδωτική δράση των προαναφερθέντων δειγμάτων με τη μέθοδο DPPH. Στη συγκεκριμένη μέθοδο θα προσδιοριστεί η ικανότητα των δειγμάτων να εξουδετερώνουν την εμπορική ελεύθερη ρίζα DPPH. Όσο μικρότερες συγκεντρώσεις από ένα δείγμα απαιτούνται για την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική του ικανότητα. Στη δεύτερη εργαστηριακή άσκηση θα εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων μέσω της ικανότητας εξουδετέρωσης της εμπορικής ελεύθερης ρίζας ABTS (Μέθοδος ABTS), αλλά και μέσω της ικανότητάς αναγωγής του ιδιαίτερα δραστικού τρισθενούς σιδήρου (Fe^{+3}) σε δισθενή (Fe^{+2}) (Μέθοδος Reducing Power). Στους ζωντανούς οργανισμούς, η οξείδωση του σιδήρου είναι συνδεδεμένη με την παραγωγή ROS. Έτσι, η ικανότητα μίας ουσίας να ανάγει το σίδηρο σχετίζεται με την αντιοξειδωτική

της δράση. Τέλος, στην τρίτη εργαστηριακή άσκηση θα αξιολογηθεί η ικανότητα των δειγμάτων να εξουδετερώνουν την ενδογενή ελεύθερη ρίζα $O_2^{\cdot-}$. Η ρίζα $O_2^{\cdot-}$ έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί θανάτωση των κυττάρων, απενεργοποίηση ενζύμων και αποικοδόμηση του DNA, των κυτταρικών μεμβρανών και των πολυσακχαριτών, ενώ συμμετέχει και στην υπεροξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων.

1^η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

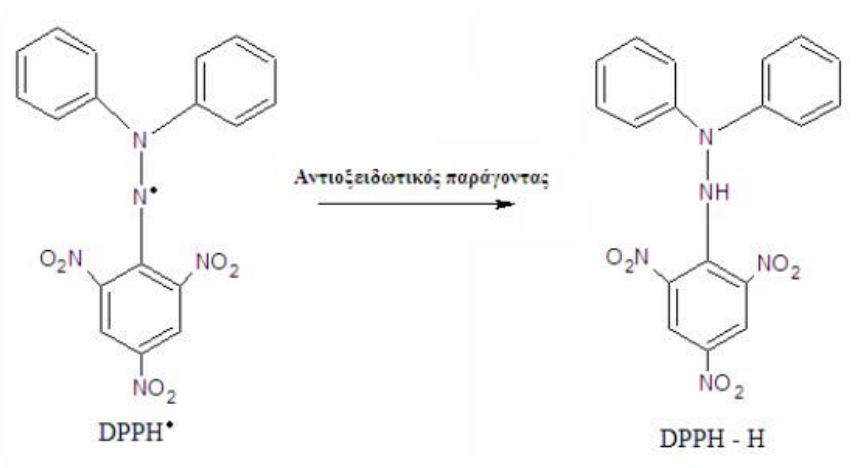
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΧΥΜΟΥ, ΚΑΦΕ, ΤΣΑΓΙΟΥ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH*

Βιοχημικό υπόβαθρο

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της αναγωγής της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH* πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Brand-Williams et al. (1995). Η μέθοδος αποτελεί μία παραλλαγή της αρχικής μεθόδου και είναι μία από τις πιο χαρακτηριστικές και απλές δοκιμασίες για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ισχύος αντιοξειδωτικών μορίων, φυτικών εκχυλισμάτων καθώς και χυμών πλούσιων σε αντιοξειδωτικά (Spanou et al. 2008; Veskoukis et al. 2012b).

Αρχή της Μεθόδου

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων μορίων ή δειγμάτων με τη σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH*). Η ρίζα DPPH* μπορεί να αδρανοποιηθεί μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al. 2005). Είναι μία σταθερή οργανική ρίζα αζώτου, η οποία έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 520 nm. Όταν στο διάλυμα της ρίζας προστεθεί μία ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε το 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH*) ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) και μετατρέπεται στην 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H), η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα τη μείωση της οπτικής απορρόφησης. Πιο αναλυτικά, για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων, των κλασμάτων και των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων, η αντίδραση με τη ρίζα πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 ml, στον οποίο περιέχονται μεθανόλη (διαλύτης), 100 μM ρίζας DPPH* και το δείγμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Μετά την προσθήκη των συστατικών της αντίδρασης τα δείγματα ανακινούνται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 520 nm.



Εικόνα 1. Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H).

Η συγκέντρωση (100 μM) της ρίζας επιλέχθηκε μετά από κατασκευή καμπύλης αναφοράς με την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης αυξανόμενων συγκεντρώσεων DPPH[•] (5, 10, 20, 40, 80, 100 μM) σε μεθανόλη. Η συγκέντρωση 100 μM βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της καμπύλης και δίνει τιμή οπτικής απορρόφησης ικανοποιητική για την παρατήρηση της μείωσής της μετά την προσθήκη αντιοξειδωτικού παράγοντα. Οι διαλύτες μεθανόλη και DMSO δεν επηρεάζουν τη μέθοδο (Visioli et al. 1998; Kruk et al. 2005).

Αντιδραστήρια

Παρασκευή διαλύματος DPPH[•] (2 mM)

Σε 25,4 ml μεθανόλης διαλύουμε 20 mg DPPH. Καλύπτουμε το ποτήρι ζέσεως με αλουμινόχαρτο καθώς το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο.

Πειραματική Διαδικασία

1. Προσθέτουμε σε φιαλίδια erpendorf τα αντιδραστήρια, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Διαλύματα	Τυφλό (Blank)	Δείγμα ελέγχου (Control)	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4
Δείγμα	-	-	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
Μεθανόλη	1000 μl	950 μl	900 μl	900 μl	900 μl	900 μl
DPPH*	-	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl

2. Αναδεύουμε καλά στο vortex και επωάζουμε για 20 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Μηδενίζουμε με το τυφλό (blank) που περιέχει μόνο μεθανόλη στα 520 nm και φωτομετρούμε τα δείγματα.

✚ Επειδή υπάρχει πιθανότητα τα συστατικά των εξεταζόμενων δειγμάτων να απορροφούν στα 520 nm, μετράται η απορρόφηση του κάθε δείγματος χωρίς την παρουσία της ρίζας DPPH*.

Η μέτρηση αυτή γίνεται ως ακολούθως:

1. Προσθέτουμε σε φιαλίδια erpendorf τα αντιδραστήρια, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Διαλύματα	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4
Δείγμα	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
Μεθανόλη	950 μl	950 μl	950 μl	950 μl

2. Αναδεύουμε καλά στο vortex, επωάζουμε για 20 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Μηδενίζουμε με το τυφλό (blank) που περιέχει μόνο μεθανόλη στα 520 nm και φωτομετρούμε τα δείγματα.

Υπολογισμοί

Η % αναγωγή (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH* υπολογίζεται από τον τύπο:

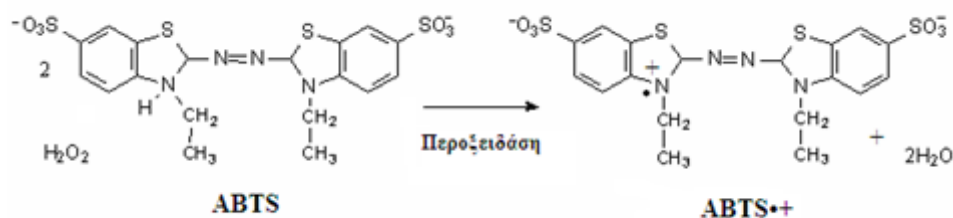
$$\% \text{ αναστολή} = (\text{Απορρόφηση control} - \text{Απορρόφηση δείγματος}) / \text{Απορρόφηση control} \times 100$$

2^η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

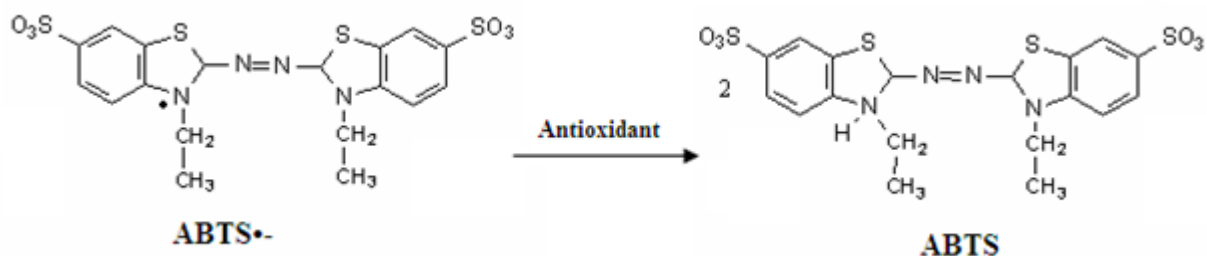
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΧΥΜΟΥ, ΚΑΦΕ, ΤΣΑΓΙΟΥ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ ABTS^{•+}

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Η ρίζα ABTS^{•+} παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS), μέσω δράσης περοξειδάσης (HRP), παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας (**Εικόνα 1**) και στην συνέχεια να ακολουθήσει η επώαση με την προς εξέταση ουσία. Η ρίζα ABTS^{•+} φέρει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου, με αποτέλεσμα τη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 1: Παραγωγή της ρίζας του ABTS^{•+} μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H₂O₂



Εικόνα 2: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με την ρίζα του ABTS^{•+}

Αντιδραστήρια

ABTS (1 mM)

MW: 548.68

Για 10 mL διαλύματος ζυγίζονται 10.97 mg ABTS και διαλύονται σε 10 ml dH₂O. Το διάλυμα παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος, είναι φωτοευαίσθητο και διατηρείται στον πάγο.

H₂O₂ (30 μM)

Από το stock διάλυμα H₂O₂ 30% 8.8 M γίνεται αραιώση με dH₂O, όπως παρατίθεται ακολούθως, ώστε να παρασκευαστεί το διάλυμα των 600 μM.

Το διάλυμα προετοιμάζεται την ημέρα του πειράματος, είναι φωτοευαίσθητο και διατηρείται στον πάγο.

1^η αραιώση 1/100 10 μl stock 30% + 990 μl dH₂O

2^η αραιώση 1/146 68 μl (1^η) + 9860 μl dH₂O

HRP

-Διαλύεται 1 mg σε 10 ml αποστειρωμένο νερό. Διατηρείται στους 4 °C μέχρι 2 μήνες.

-Διατηρείται στους -80 °C.

-Γίνεται μια αραιώση 1/20 και χρησιμοποιείται αυτό το διάλυμα για την αντίδραση (τυπικά 100 μl από το stock + 1900 μl dH₂O).

-Το διάλυμα προετοιμάζεται την ημέρα του πειράματος, είναι φωτοευαίσθητο και διατηρείται στον πάγο.

Πειραματική Διαδικασία

Για την μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων συγκεντρώσεων μιας εξεταζόμενης ουσίας, η αντίδραση πραγματοποιείται σε πλαστικά erpendorfs 1.5 ml, σε τελικό όγκο 1 ml, στο οποίο περιέχεται ABTS 1 mM, H₂O₂ 30 μM και HRP 6 μM.

1. Τα διαλύματα προστίθενται με την σειρά που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**, αναδεύονται σε vortex και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min.

2. Στη συνέχεια, προστίθεται το εξεταζόμενο δείγμα σε διάφορες συγκεντρώσεις, όπως φαίνεται στον πίνακα.

3. Ακολουθεί ανάδευση με vortex και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm.

Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

Πίνακας 1.

3x	Blank	Control	1(C₁)	2(C₂)	3(C₃)	4(C₄)	5(C₅)
H₂O	450 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
H₂O₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
HRP	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
Ντελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Δείγμα	-	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL

✚ Επειδή υπάρχει η πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου.

3x	1(C₁)	2(C₂)	3(C₃)	4(C₄)	5(C₅)
H₂O	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
H₂O₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
Ντελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Δείγμα	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL

Υπολογισμοί

Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = (\text{Απορρόφηση control} - \text{Απορρόφηση δείγματος}) / \text{Απορρόφηση control} \times 100$$

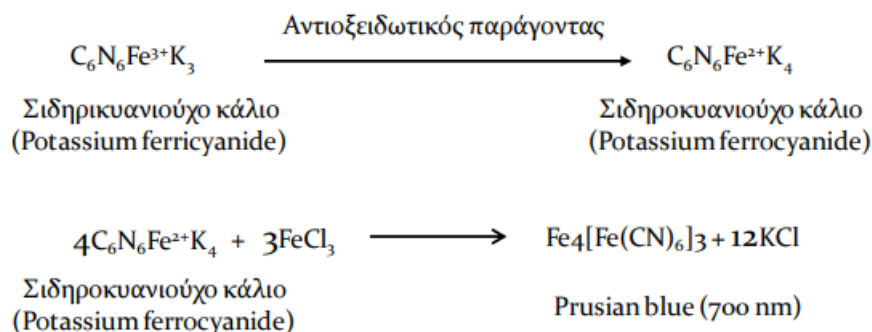
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΧΥΜΟΥ, ΚΑΦΕ, ΤΣΑΓΙΟΥ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ REDUCING POWER (ΑΝΑΓΩΓΙΚΗ ΙΣΧΥΣ)

Βιοχημικό υπόβαθρο

Η αναγωγική δύναμη διαφόρων ουσιών προσδιορίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Yen and Duh, (1994). Η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων δειγμάτων. Ενώσεις με ισχυρή αναγωγική δύναμη (ισχυρά αντιοξειδωτικά) είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν τα οξειδωμένα μόρια, που παράγονται κατά την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Σε αυτή τη δοκιμασία, το κίτρινο χρώμα του υπό μελέτη διαλύματος αλλάζει σε διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε, ανάλογα με την αναγωγική δύναμη της κάθε μελετώμενης ουσίας. Παρουσία αναγωγικού περιβάλλοντος προκαλείται μετατροπή του συμπλόκου Fe^{+3} /σιδηρικούανιούχο κάλιο στην ανηγμένη μορφή του σιδήρου (Fe^{+2}). Με τη μέτρηση του σχηματισμού του κυανού χρώματος (Pearl's Prussian blue) στα 700 nm είναι δυνατό να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του Fe^{+3} .

Αρχή της Μεθόδου

Ουσίες με αναγωγική ισχύ αντιδρούν με το σιδηρικούανιούχο κάλιο ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$) (που περιέχει Fe^{+3}) και το ανάγουν σε ανηγμένο σιδηροκυανιούχο κάλιο ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_4$) (που περιέχει Fe^{+2}), το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με τριχλωριούχο σίδηρο και παράγεται ένα σύμπλοκο με μέγιστο απορρόφησης στα 700 nm, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Αντιδραστήρια

1) Ρυθμιστικό διάλυμα με φωσφορικά και νάτριο (sodium phosphate buffer) (0,2 M, pH = 6,6)

Για να φτιάξουμε το διάλυμα αυτό, διαλύουμε 13,9 g δισόξινου φωσφορικού νατρίου (sodium phosphate monobasic, NaH_2PO_4) σε 500 ml απιονισμένου νερού και 26,825 g όξινου φωσφορικού δινατρίου (sodium phosphate dibasic heptahydrate, Na_2HPO_4) σε 500 ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 62,5 ml του πρώτου διαλύματος και 37,5 ml του δεύτερου διαλύματος σε 200 ml απιονισμένου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 6,6.

2) Σιδηρικούανιούχο κάλιο (Potassium ferricyanide, $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$, 1% w/v)

Διαλύουμε 0,1 g $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$ σε 10 ml απιονισμένου νερού. Τυλίγουμε το διάλυμα με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

3) Χλωριούχος τρισθενής σίδηρος (Ferric chloride, FeCl_3 0,1 % w/v)

Διαλύουμε 0,01 g FeCl_3 σε 10 ml απιονισμένου νερού. Τυλίγουμε το διάλυμα με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

4) Τριχλωροξικό οξύ (Trichloroacetic acid, TCA, 10% w/v)

Προσθέτουμε 10 ml από ένα πυκνό διάλυμα TCA περιεκτικότητας 100% σε 90 ml απιονισμένου νερού.

Πειραματική Διαδικασία

1. Προσθέτουμε σε φιαλίδια errendorf τα αντιδραστήρια, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

3X	Blank	Control	C1	C2	C3
Δείγμα	-	-	50 μl	50 μl	50 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (0.2 M, pH = 6.6)	500 μl	250 μl	200 μl	200 μl	200 μl
Σιδηρικούανιούχο κάλιο	-	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl

2. Επωάζουμε στο heat block στους 50°C για 20 λεπτά.
3. Κρυώνουμε τα δείγματα και προσθέτουμε 250 μl TCA 10% σε κάθε φιαλίδιο.
4. Φυγοκεντρούμε στα 3000 rpm για 10 λεπτά.
5. Μεταφέρουμε 700 μl από το υπερκείμενο σε νέα erpendorf και προσθέτουμε 250 μl απιονισμένου νερού και 50 μl διαλύματος χλωριούχου τρισθενούς σιδήρου.
6. Επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομετρούμε στα 700 nm.

✚ Επειδή υπάρχει πιθανότητα να απορροφούν τα συστατικά των εξεταζόμενων δειγμάτων στα 700 nm, μετράται η απορρόφηση του κάθε δείγματος χωρίς την παρουσία του σιδηρικού τρισθενούς οξείδου. Η μέτρηση αυτή γίνεται ως ακολούθως:

1. Προσθέτουμε σε φιαλίδια erpendorf τα αντιδραστήρια, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

3X	C1	C2	C3
Δείγμα	50 μl	50 μl	50 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (0.2 M, pH = 6.6)	450 μl	450 μl	450 μl
TCA	250 μl	250 μl	250 μl
dH₂O	250 μl	250 μl	250 μl
Χλωριούχος τρισθενής σίδηρος	50 μl	50 μl	50 μl

3^η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΧΥΜΟΥ, ΚΑΦΕ, ΤΣΑΓΙΟΥ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ ΣΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ($O_2^{\bullet-}$)

Αρχή της μεθόδου

Η ρίζα $O_2^{\bullet-}$ έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί θανάτωση των κυττάρων, απενεργοποίηση ενζύμων και αποικοδόμηση του DNA, των κυτταρικών μεμβρανών και των πολυσακχαριτών. Επίσης, εμφανίζει σημαντική δράση στην υπεροξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και πιθανώς άλλων ευαίσθητων βιομορίων. Οι ανιονικές ρίζες σουπεροξειδίου προκύπτουν από το σύστημα PMS-NADH, ως αποτέλεσμα της οξείδωσης του NADH. Το $O_2^{\bullet-}$ μειώνει το προερχόμενο από το NBT²⁺ κίτρινο χρώμα, καθώς το οξειδώνει και τελικά εμφανίζεται ένα μπλε χρώμα το οποίο απορροφά στα 560 nm. Συνεπώς, ουσίες που διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό του μπλε NBT.

Αντιδραστήρια

1) Tris-HCl buffer (16 mM, pH = 8.0)

Αρχικά παρασκευάζεται δ/μα 1M (250 ml)

1000 ml 1*121.4 g

250 ml x=30.285 g

Ρυθμίστηκε το pH με HCl στο 8

Μετά $c_1V_1=c_2V_2 \rightarrow 1000 \text{ mM} * V_1=16 \text{ mM} * 150 \text{ ml} \rightarrow V_1=2.4 \text{ ml}$ πάρθηκαν από το αρχικό 1M για να παρασκευαστούν 150 ml

2) NBT (nitroblue tetrazolium) (300 μM), MW=817.7

Για 20 ml ζυγίζονται 20 mg NBT.

3) NADH (468 μM), MW=709.4

Για 20 ml ζυγίζονται 6,64 mg NADH.

4) PMS (phenazine methosulfate) (60 μ M), MW=306.34

Για 20ml δ/τος ζυγίζονται 0,368 mg PMS.

Πειραματική Διαδικασία

Σε 625 μ l Tris-HCl (16 mM, pH = 8.0) προστίθενται 125 μ l NBT (300 μ M), 125 μ l NADH (468 μ M) και 50 μ l δείγματος. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 125 μ l PMS (60 μ M) στο μείγμα. Τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά και μετράται η απορρόφηση στα 560 nm. Μειωμένη απορρόφηση σημαίνει αυξημένη δραστηριότητα εξουδετέρωσης των ανιόντων σουπεροξειδίου.

3X	Blank	Control	C1	C2	C3
Δείγμα	-	-	50 μ l	50 μ l	50 μ l
dH₂O	-	50 μ l	-	-	-
Tris-HCl (16 mM, pH = 8.0)	800 μ l	625 μ l	625 μ l	625 μ l	625 μ l
NBT (300 μM)	125 μ l	125 μ l	125 μ l	125 μ l	125 μ l
NADH (468 μM)	125 μ l	125 μ l	125 μ l	125 μ l	125 μ l
PMS (60 μM)	-	125 μ l	125 μ l	125 μ l	125 μ l

Για τα αρνητικά control:

3X	C1	C2	C3
Δείγμα	50 μ l	50 μ l	50 μ l
dH₂O	-	-	-
Tris-HCl (16 mM, pH = 8.0)	750 μ l	750 μ l	750 μ l
NBT (300 μM)	125 μ l	125 μ l	125 μ l
NADH (60 μM)	125 μ l	125 μ l	125 μ l

Υπολογισμοί

Η ικανότητα εξουδετέρωσης της O₂^{•-} υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = (\text{Απορρόφηση control} - \text{Απορρόφηση δείγματος}) / \text{Απορρόφηση control} \times 100$$

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ames BN, Catchcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:6858-62, 1981.
2. Antunes F, Derick H, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med* 33(9):1260-7, 2002.
3. Betteres JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, Deruisseau KC, Deering M, Yimlamai T, Powers SK. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am J Respir Crit Care Med* 170:1179-1184, 2004.
4. Brantley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, Singleton EW, Olson JS. The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 268(10):6995-7010, 1993.
5. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 28:25-30, 1995.
6. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605, 1979.
7. Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 30(2):280-5, 2002.
8. Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270(5639):725-727, 1977.
9. Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 10:25-40, 2001.
10. Goutzourelas N, Stagos D, Demertzis N, Mavridou P, Karterolioti H, Georgadakis S, Kerasioti E, Aligiannis N, Skaltsounis L, Statiri A, Tsioutsouliti A, Tsatsakis AM, Hayes AW, Kouretas D. Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Hum Exp Toxicol* 33(11):1099-112, 2014.
12. Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 20(2):55-9, 1988.

13. Halliwell B, Gutteridge JMC (2015). Free radicals in biology and chemistry. New York: Oxford Science Publications, Sixth Edition.
14. Hansford R, Hogue BA, Mildaziene V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Bioenerg Biomembr* 29:89-95, 1997.
15. Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 5:156-70, 1988.
16. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:283-292, 1999.
17. Kruk I, Aboul-Enein HY, Michalska T, Lichszteld K, Kładna A. Scavenging of reactive oxygen species by the plant phenols genistein and oleuropein. *Luminescence* 20:81-9, 2005.
18. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 32(9):790-6, 2002.
19. Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction. *Acta Physiol Scand* 171:233-9, 2001.
20. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13:295-309, 1999.
21. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med*. 38(7):579-606, 2008.
22. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53:4290-302, 2005.
23. Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno, H. Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol* 72:189-194, 1996.
24. Reid MB. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 90:724-31, 2001.
25. Sies, H., Jones, D. P., 2007. Oxidative stress. *Encyclopedia of Stress*, 3, 45-48.

26. Sjödín B, Hellsten Westing Y, Apple FS. Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 10:236-54, 1990.
27. Spanou C, Bourou G, Dervishi A, Aligiannis N, Angelis A, Komiotis D, Skaltsounis AL, Kouretas D. Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts. *J Agric Food Chem* 56(16):6967-76, 2008.
28. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277:44784-44790, 2002.
29. Veskoukis AS, Kyparos A, Nikolaidis MG, Stagos D, Aligiannis N, Halabalaki M, Chronis K, Goutzourelas N, Skaltsounis L, Kouretas D. The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus. *Oxid Med Cell Longev* 2012:185867, 2012b.
30. Veskoukis AS, Tsatsakis AM, Kouretas D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones* 17(1):11-21, 2012a.
31. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 16(7-8):716 8, 2000. Viña J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 50:271-277, 2000.
32. Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Com* 247:60-4, 1998.
33. Yen GC, Duh PD. Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42:629-632, 1994.
34. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 29(2):358-62, 2001.